



## INFLUENCIA DEL PASTOREO DE ALFALFA O ESPARCETA SOBRE LOS PARÁMETROS PRODUCTIVOS Y REPRODUCTIVOS DE OVEJAS Y CORDEROS

Sandra Lobón Ascaso, Mireia Blanco Alibés, Albina Sanz Pascua, Pablo José Rufino Moya, Francisco Molino Gahete y Margalida Joy Torrens\*

Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria del Gobierno de Aragón. Instituto Agroalimentario de Aragón – IA2 (CITA-Universidad de Zaragoza).  
Avda. Montañana 930, 50059 Zaragoza.

## INFLUENCE OF ALFALFA OR SAINFOIN GRAZING ON PRODUCTIVE AND REPRODUCTIVE PARAMETERS IN EWES AND LAMBS

### Historial del artículo:

Recibido: 30/09/15

Revisado: 14/01/16

Aceptado: 22/03/16

Disponible online: 20/04/16

### \* Autor para correspondencia:

mjoy@aragon.es

ISSN: 2340-1672

Disponible en: <http://polired.upm.es/index.php/pastos>

### Palabras clave:

Calidad nutritiva, compuestos secundarios, metano, cubrición.

### Keywords:

Nutritive value, secondary compounds, methane, mating.

## RESUMEN

Se utilizaron parejas de oveja-cordero pastoreando en alfalfa (n=21) o esparceta (n=21) durante la lactación de primavera. Tras el destete, las ovejas permanecieron en las mismas parcelas hasta que finalizó el periodo de cubrición. A continuación se agruparon y mantuvieron el mismo manejo hasta el siguiente parto. A lo largo de la lactación, la producción de esparceta presentó un máximo a finales de abril y fue descendiendo hasta finales de mayo, mientras que la producción de alfalfa fue más homogénea en los diferentes cortes. Durante las primeras semanas de crecimiento (abril), ambos cultivos presentaron similar contenido en materia seca (MS), fibra neutro detergente (FND) y proteína bruta (PB). Posteriormente, la alfalfa presentó menor MS, FND y mayor PB que la esparceta ( $P < 0,05$ ). La esparceta presentó mayor contenido en taninos condensados totales y  $\alpha$ -tocoferol que la alfalfa ( $P < 0,05$ ). La producción de gas y de metano dependió de la especie forrajera y del momento de aprovechamiento. Las ovejas presentaron similar peso y condición corporal de abril a junio, a partir de entonces las ovejas de alfalfa presentaron mayores pesos y condiciones corporales. Los corderos en pastoreo de alfalfa presentaron menor crecimiento diario que los de esparceta durante la lactación ( $P < 0,05$ ). La fertilidad de las ovejas tras el destete fue similar en ambos tratamientos (90,5%). La descendencia del siguiente parto de las ovejas de alfalfa presentó menor peso al nacimiento que la de esparceta ( $P < 0,05$ ), debido quizá a la mayor prolificidad ( $P < 0,05$ ). También se observó un desequilibrio en el ratio de hembras/machos, a favor de las hembras, aunque las diferencias no fueron significativas. El pastoreo de esparceta sería recomendable para aumentar la ganancia de los corderos en lactación, sin embargo las ovejas en alfalfa presentaron mayor prolificidad. Será necesario realizar futuros estudios para confirmar dichos resultados.

## ABSTRACT

Ewe-lamb pairs grazed alfalfa (n=21) or sainfoin (n=21) parcels during spring lactation. After weaning, the dams grazed the same forages until mating. After mating, ewes were grouped and had the same management until the following lambing. Sainfoin production showed a maximum in late April and thereafter decreased with a minimum at the end of May, while the production of alfalfa was more constant. During the first weeks (April), both crops showed similar dry matter (DM), neutral detergent fiber (NDF) and crude protein (CP) contents. Afterwards, alfalfa had lower DM, NDF and greater CP ( $P < 0.05$ ) contents than sainfoin. Sainfoin showed higher  $\alpha$ -tocopherol content and total condensed tannins than alfalfa ( $P < 0.05$ ). The gas and methane production depended on the forage species and the time of use. Ewes had similar live weight and condition score from April to June. After this time, Alfalfa ewes were heavier and had better condition scores than Sainfoin ewes. Alfalfa lambs had lower daily gains than Sainfoin lambs during lactation ( $P < 0.05$ ). Fertility rate was similar in both groups (90.5%). The Alfalfa offspring was lighter at lambing than the Sainfoin offspring ( $P < 0.05$ ), probably due to the higher prolificacy ( $P < 0.05$ ). An imbalance in the ratio female/male for females was observed in the Sainfoin ewes, although the differences were not significant. Therefore, grazing sainfoin would be advisable to increase weight gains of lambs in lactation, and grazing alfalfa during mating was associated with an increased prolificacy. Future studies will be needed to confirm these results.



Ovejas junto a sus corderos pastando esparceta (izquierda) y alfalfa (derecha) durante el periodo de lactación.



Ewes with their lambs grazing sainfoin (left) and alfalfa (right) during the lactation period.

© Mireia Blanco

## INTRODUCCIÓN

La esparceta (*Onobrychis viciifolia* Scop.) y la alfalfa (*Medicago sativa* L.) son dos leguminosas forrajeras plurianuales muy utilizadas en los secanos del noreste de España. Ambos forrajes presentan una gran capacidad productiva, un alto valor nutritivo y una acción restauradora de la fertilidad del suelo. Estas dos especies tienen características comunes, pero también presentan diferencias notables, entre las que destaca la presencia de taninos condensados en la esparceta pero no en la alfalfa. Según diversos autores, los taninos condensados podrían afectar indirectamente a parámetros productivos y a determinados parámetros ruminales, ya que son capaces de unirse a las proteínas en el rumen disminuyendo su degradación y favoreciendo el flujo al intestino donde la absorción de aminoácidos es mayor (Waghorn *et al.*, 1987; Wang *et al.*, 1996; Ramírez-Restrepo y Barry, 2005; Waghorn, 2008). Sin embargo, los resultados difieren entre estudios, ya que muchos factores están implicados, entre los que destacan la estructura y la cantidad de taninos condensados presentes en el alimento (Min *et al.*, 2003). Dichos taninos tienen efectos positivos sobre la salud animal por sus propiedades antihelmínticas (Niezen *et al.*, 1995; Molan *et al.*, 2000) y por la prevención del meteorismo en los rumiantes, problema que sí se detecta en el pastoreo de gran cantidad de alfalfa (Jones *et al.*, 1973), tras una restricción alimenticia.

La alimentación materna durante las primeras etapas del desarrollo embrionario puede ser determinante para la vida adulta, ya que es el momento en el que se producen cambios sustanciales que condicionarán la diferenciación celular del embrión (Rhind, 2004). En los últimos años se han estudiado los efectos de la subnutrición y sobrealimentación alrededor de la cubrición (Abecia, *et al.*, 2006; Bloomfield, 2011). Sin embargo, son pocos los estudios realizados sobre los efectos que puede tener el tipo de alimentación que pastan las ovejas entre el destete y la cubrición sobre los rendimientos productivos y reproductivos o sobre su descendencia.

El objetivo del presente trabajo ha sido estudiar, por una parte la composición química y los contenidos en carotenoides,  $\alpha$ -tocoferol y taninos condensados totales en los cultivos de alfalfa y de esparceta durante su ciclo productivo (abril-agosto); y por otra parte el rendimiento de las ovejas y los corderos mantenidos en pastoreo de alfalfa o esparceta.

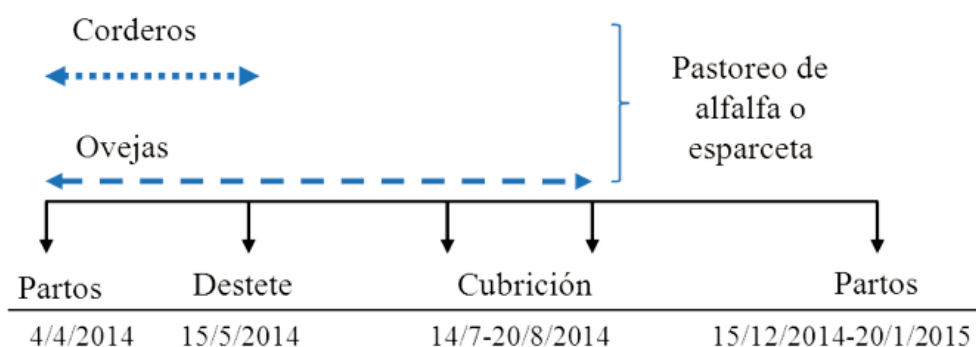
## MATERIALES Y MÉTODOS

El manejo de los animales siempre se realizó bajo las directrices de la normativa vigente referente a experimentación animal de la Unión Europea (European Communities, 1986).

### Diseño experimental

El ensayo se realizó en la Finca Experimental del Soto Lezcano, en Zaragoza, en dos parcelas preparadas para riego a manta, que es la práctica habitual en la finca. Las labores de preparación del suelo, previas al establecimiento del ensayo, consistieron en un pase de chisel seguido de dos pases de grada. Como abonado de fondo se aportaron 100 kg/ha del complejo NPK 0-10-10. No se aplicaron herbicidas de presiembr. Las dosis de siembra fueron de 90 y 25 kg/ha para la esparceta y alfalfa, respectivamente, dosis habituales en la zona para dichos cultivos. Cada cultivo tenía una superficie de 1 ha, que se dividía en 5 parcelas para llevar a cabo la rotación semanal de los animales en pastoreo. La siembra del ensayo se realizó en septiembre de 2013 y en primavera del 2014 fue cuando se inició el pastoreo.

Se realizó una cubrición controlada de todo el rebaño en octubre del 2013, con el fin de disponer de corderos con similares condiciones de peso y edad. Tras el parto se utilizaron 42 parejas oveja-cordero macho de la raza Rasa Aragonesa, de parto simple. Se hicieron 2 lotes homogéneos en peso, condición corporal y edad de las madres, así como en peso de los corderos. El periodo experimental (Figura 1) duró desde el inicio de la paridera (3 abril 2014) hasta el final de



**FIGURA 1.** Diseño experimental del ensayo, pastoreo de ovejas (desde el parto hasta final de la cubrición) y corderos (durante la lactación) en praderas de alfalfa y esparceta.

**FIGURE 1.** Experimental design. Ewes (from lambing to the end of mating) and lambs (during lactation) grazing alfalfa or sainfoin.

la siguiente cubrición de las ovejas (20 agosto 2014), aunque los controles realizados se prolongaron hasta la siguiente paridera (enero 2015). Las parejas oveja-cordero se dividieron en 2 tratamientos:

- Pastoreo de alfalfa (*Medicago sativa* L, cv Aragón): Ovejas y corderos en pastoreo rotacional durante la lactación desde el parto hasta los 45 días de vida. En este momento los corderos se destetaron, se estabularon y se cebaron con concentrado. Las ovejas permanecieron en las praderas de alfalfa hasta el final de la siguiente cubrición (n=21).
- Pastoreo de esparceta (*Onobrychis viciifolia* Scop, cv Reznos): El mismo manejo que el grupo anterior, pero en este caso se utilizó esparceta como forraje (n=21).

Durante la lactación, todos los corderos tuvieron acceso a la leche materna, al pasto y al concentrado *ad libitum* (proteína bruta (PB): 20,3 % materia seca (MS), fibra neutro detergente (FND): 16,3 % MS, fibra ácido detergente (FAD): 3,4 % MS, lignina ácido detergente (LAD): 0,54 % MS). Las ovejas no recibieron ninguna suplementación durante el pastoreo. Tras el destete de los corderos, las ovejas permanecieron en sus respectivas parcelas de alfalfa o esparceta. A mediados de julio se introdujeron machos en cada una de los cultivos para realizar la cubrición controlada por monta natural durante 35 días. Después, las ovejas de ambos grupos se reagruparon y siguieron el mismo manejo y alimentación. Todos los animales tuvieron libre acceso al agua y sales minerales.

## Muestreo y controles

Durante la lactación (40-45 días de media), semanalmente los animales rotaban de parcela. Previo a la entrada de los animales se llevaba a cabo un muestreo de forraje para estimar la producción. Para ello se tomaron, al azar, 5 muestras de 0,25 m<sup>2</sup> por parcela. Tras el destete, las ovejas pasaron a tener un manejo general, en el que se aseguró la disponibilidad del cultivo correspondiente.

Desde el parto hasta el destete, todos los animales se pesaron semanalmente con una balanza electrónica (0,1 kg de precisión). La ganancia media diaria de los corderos se estimó por regresión lineal del peso sobre la edad.

Tras el destete, se controló el peso y la condición corporal de las ovejas y se registraron los parámetros reproductivos del siguiente ciclo (enero 2015): la fertilidad (número de ovejas paridas por 100 ovejas cubiertas), prolificidad (media de corderos nacidos vivos y muertos por ovejas paridas) y fecundidad (media de corderos nacidos vivos y muertos por ovejas cubiertas). Se calculó la mortalidad en el periparto y el ratio de hembras/machos nacidos en el parto posterior al pastoreo de los cultivos de alfalfa y esparceta.

## Análisis químicos

Las muestras de forraje se pesaron y se dividieron en tres submuestras. Una submuestra fue desecada a 60°C en estufa de ventilación forzada hasta peso constante y se destinó a la determinación de la composición química. Otra submuestra se congeló a -20°C y se liofilizó para la determinación de taninos condensados totales. La tercera submuestra fue almacenada a 4°C hasta el día siguiente del muestreo, para la determinación de carotenoides y tocoferoles de los alimentos en fresco. Una vez que las muestras estaban secas se procedió a su molienda con un molino de cuchillas provisto de una malla de 1 mm de diámetro para la composición química y producción de gas y 0,2 mm para la determinación de taninos condensados totales. Una vez molidas, las muestras se almacenaron hasta posterior análisis.

Los análisis químicos de la materia seca del alimento y el contenido en cenizas se determinaron de acuerdo con los métodos AOAC, el contenido en PB por el método Dumas (AOAC, 1999) y el contenido en FND, FAD y LAD por el método Van Soest *et al.*, (1991).

Para la determinación de los contenidos en carotenoides y en tocoferoles se evitó que el alimento estuviera expuesto a la luz solar, analizándose muestras semanalmente desde la lactación hasta el inicio del verano. La metodología seguida para la extracción de dichos compuestos fue la de Val *et al.*, (1994). Se pesaron 0,2 g de alimento con una balanza de precisión y se introdujeron en un tubo falcón de 15 ml protegido de la luz. Posteriormente, se añadieron 0,03 g de ascorbato de sodio y 5 ml de acetona. Seguidamente, los tubos se taparon y se homogenizaron con un ultra-turrax (ART-MICCRAD-8) durante 30 segundos. Para una extracción mejor de los carotenoides y tocoferoles, los tubos se pasaron a un homogeneizador vertical donde permanecieron durante 20 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, se extrajo el sobrenadante del tubo con una pipeta Pasteur de 1 ml y se trasvasó a un vial ámbar tras su filtrado a través de una membrana de 0,45 micras.

El retinol, la luteína, el  $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -tocoferol y  $\gamma$ -tocoferol se determinan por cromatografía de líquidos de alta resolución (UHPLC, Acquity H-Class, Water; Milford, Massachusetts, EE. UU). La separación de los compuestos se realizó con una columna Kinetex RP C<sub>18</sub>, de 100x4,6 mm y 2,1 micras, estando dicha columna en línea con un filtro pre-columna Krud-Katcher ultra HPLC. El equipo de cromatografía líquida estaba equipado con dos detectores, un detector de red de fotodiodos con un barrido de 210 a 600 nm y otro de fluorescencia. La luteína y el  $\beta$ -caroteno se detectaron con el detector de red de fotodiodos a 450 nm, el retinol con el detector de fluorescencia a una longitud de onda de excitación ( $\lambda_{ex}$ ) de 317 nm y de emisión ( $\lambda_{em}$ ) de 468 nm, y finalmente, los tocoferoles con el detector de fluorescencia a  $\lambda_{ex}$  293 nm y  $\lambda_{em}$  322. La fase móvil era metanol (con 0,05% de trietanolamina) con un flujo de 1,5 ml/min en isocrático. El análisis se llevó a cabo a una temperatura controlada, usando un horno de columna a 35°C y una cámara de muestras preinyección a 15°C en el automuestreador. El tiempo de análisis fue de 6 minutos. Los compuestos se identificaron mediante la comparación con los tiempos de retención y espectro de sus respectivos estándares (>95%). La disolución de los respectivos estándares (Sigma Aldrich) se realizó en metanol evitando el contacto con la luz y se guardaron a -80°C. La concentración exacta se determinó por espectrofotometría. Se realizaron hasta siete disoluciones por cada estándar (500 a 0,1  $\mu$ g/ml) para elaborar una curva de calibración con siete puntos. También se efectuó una evaluación preliminar de la metodología analítica empleada que incluyó estudios de especificidad, sensibilidad, recuperación y precisión.

La cuantificación de los taninos condensados totales se realizó mediante la técnica de HCl-Butanol siguiendo el método de Grabber *et al.*, (2013). Se pesaron 0,03 g de muestra previamente liofilizada y molida en tubos de 12 ml, se añadieron 10 ml del solvente de extracción (3,3 ml de agua, 5,0 ml de HCl 12 M, 42 ml de n-butanol y 50 ml de acetona) y se agi-

taron durante 20 minutos en vórtex orbital múltiple. Los tubos se calentaron a 85°C durante 2 horas, se enfriaron durante 15 minutos y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 5 minutos. Finalmente, las muestras se leyeron con el espectrofotómetro Helios Beta (Thermo Electron Corporation, España) a 550 nm. La concentración se expresó en equivalente de cianidina, la cual se utilizó como estándar.

La producción de gas y la estimación de la desaparición de la materia seca se realizaron utilizando el sistema de Ankom (Ankom technology, NY, EE. UU.). Dicho sistema utiliza botes de 310 ml de capacidad, dotados de un sensor de presión y de temperatura. Se seleccionaron 5 muestras de cada forraje espaciado en el tiempo (15-4, 28-4, 8-5, 17-6, 5-8). Se pesaron las muestras (0,5 g), previamente secadas y molidas siguiendo la metodología anteriormente expuesta, y se incubaron con 60 ml de la solución tamponada de saliva:líquido ruminal (2:1 v/v) durante 24 horas. El líquido ruminal procedía de 4 moruecos fistulizados en rumen y alimentados con una dieta constituida por heno de alfalfa (PB: 18,46% MS, FND: 44,46% MS, FAD: 34,31% MS y LAD: 7,21% MS) y cebada en una proporción de 70:30. Los animales tenían libre acceso a agua y minerales. El líquido ruminal se obtuvo antes de la ingestión de la dieta por la mañana y se trasladó inmediatamente al laboratorio. Tras ser filtrado a través de cuatro capas de gasa, se hizo un pool de los cuatro líquidos ruminales para reducir los efectos que pudiera tener el líquido ruminal o el ambiente en una tanda, como sugiere Udén *et al.* (2012). El líquido ruminal se mezcló con la solución tampón, basado en el protocolo de Menke y Steingass (1988) en una proporción 1:2. La solución final se colocó en un baño a 39°C con un flujo continuo de CO<sub>2</sub>. Cada muestra se analizó por triplicado en una única tanda. Se añadieron tres blancos con el fin de corregir la producción de gas del líquido ruminal sin muestra. A las 24 horas se recogieron 8 ml de gas en tubos de 5 ml para la cuantificación de la producción de metano. El metano se determinó con detector de ionización de llama (Cromatógrafo de gases H-P4890), equipado con una columna capilar GS-DB-WAX (J&N Scientific), 30 m, 0,25 mm id y 0,25 micras de espesor del film. El gas conductor utilizado fue el helio con un ratio de flujo 1 ml/min. Las tasas de flujo de helio y aire sintético fueron 35 y 350 ml/min, respectivamente. La temperatura de la entrada, del detector y del horno se mantuvo a 200, 250 y 70°C (programa isotérmico), respectivamente. El volumen de inyección fue de 200  $\mu$ l. Cada muestra se inyectó manualmente con una jeringa hermética Hamilton. La identificación del metano se basó en el tiempo de retención comparado con el metano estándar. El tiempo de análisis fue de 3 minutos (incluido el tiempo de estabilización). Las producciones de gas y de metano se expresaron como el total producido (ml/g MS). La muestra incubada junto con su líquido ruminal se traspasó a sacos de nylon de 49 micras de diámetro, los cuales se pesaron y se desecaron para estimar la desaparición de la materia seca.

	Forraje		e.e. <sup>1</sup>	A	P-valor	
	Alfalfa	Esparceta			Forraje	A*Forraje
Materia seca	22,17	22,97	0,21	0,001	0,32	0,001
Cenizas	9,36	7,95	0,05	0,001	0,001	0,001
Proteína bruta	22,75	16,34	0,13	0,001	0,001	0,001
Fibra neutro detergente	39,60	45,38	0,30	0,001	0,001	0,001
Fibra ácido detergente	25,54	32,32	0,26	0,001	0,001	0,001
Lignina ácido detergente	5,21	8,26	0,18	0,001	0,001	0,12

<sup>1</sup> error estándar de la media.

**TABLA 1.** Valores medios de la composición química de la alfalfa y la esparceta (% sobre materia seca) y significancia (P) de los efectos momento de aprovechamiento (A), tipo de forraje e interacción de ambos.

**TABLE 1.** Mean values of chemical composition of alfalfa and sainfoin (% of dry matter) and significance (P) of the effects grazing time (A), forage type and their interaction.

## Análisis estadísticos

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el paquete estadístico SAS (v.9.3). Se realizaron análisis de varianza de los parámetros producción y calidad del forraje, contenido en compuestos secundarios, y producción de gas y de metano con un modelo lineal general (procedimiento GLM), con el tratamiento y las semanas de aprovechamiento como efectos fijos. Los pesos de las ovejas y de los corderos se analizaron mediante el análisis de medidas repetidas (procedimiento MIXED), con el tipo de alimento, la fecha y sus interacciones como efectos fijos y el animal como efecto aleatorio. Se obtuvieron las medias mínimo cuadráticas, el error estándar (e.e.) y se compararon las medias mediante el test de Tukey. La fertilidad, el ratio hembras/machos y la mortalidad al parto se analizaron mediante una prueba  $\chi^2$  (procedimiento FREQ) mediante el test de Fisher.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

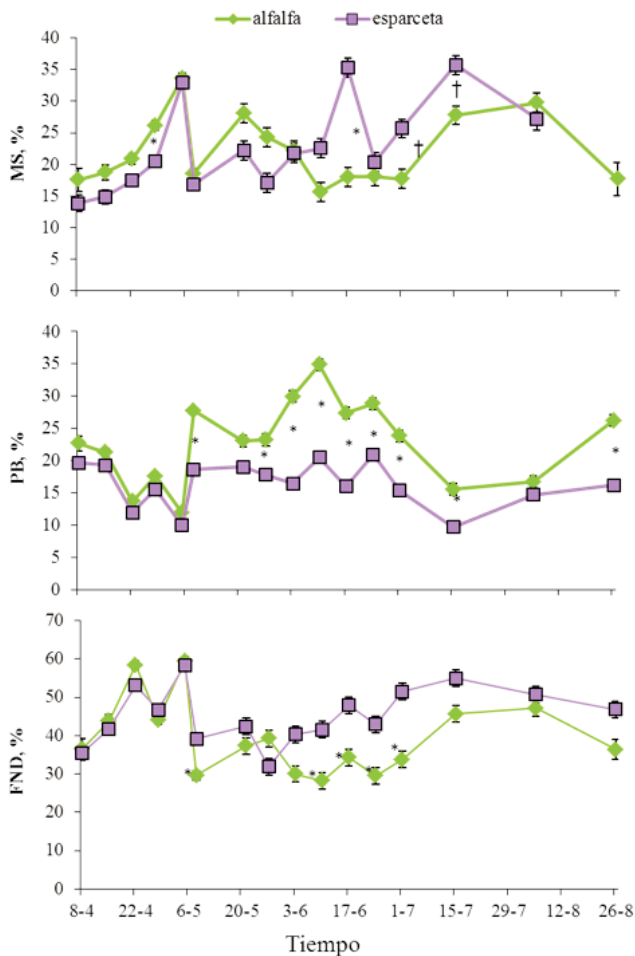
### Producción forrajera

Durante la lactancia del cordero la evolución de la producción de alfalfa y esparceta fue diferente. La producción de esparceta fue más concentrada, con un máximo a finales de abril ( $7568 \pm 39,81$  kg MS/ha), siendo superior en ese momento a la de alfalfa ( $3994 \pm 9,6$  kg MS/ha). Posteriormente, la producción de esparceta fue disminuyendo hasta alcanzar un mínimo de 1380 kg MS/ha a principios de mayo. Dicho comportamiento concuerda con lo esperado, ya que la esparceta es un cultivo que se caracteriza por concentrar la producción de forraje en primavera, además de tener una baja capacidad de rebrote tras el primer corte y mucho menor que la que presenta la alfalfa. Por el contrario, la producción de alfalfa estuvo más repartida durante todo el periodo de aprovechamiento, presentando unas producciones mínimas y máximas de  $1391 \pm 6,6$  (22 de abril) y  $4314 \pm 71,9$  kg MS/ha (8 de mayo), respectivamente. Cuando se estudia todo el ciclo productivo la alfalfa, debido a su capacidad de producir rebrotes de elevada producción, presenta una mayor producción frente a la esparceta en regadío (Martiniello, 1998; Peel *et al.*, 2004; Delgado *et al.*, 2008).

La composición química de los dos forrajes se determinó desde el inicio del pastoreo tras los partos de primavera hasta la posterior cubrición de las ovejas (abril a agosto), dado que uno de los objetivos era estudiar el efecto de la composición del forraje sobre algunos parámetros reproductivos. Se observó que la composición química estaba afectada por la interacción entre el momento de aprovechamiento y el forraje, tal y como se muestran en la Tabla 1. De media, la alfalfa presentó un mayor contenido en PB y un menor contenido en FND, FAD y LAD que la esparceta ( $P < 0,001$ ). Desde abril hasta principio de junio ambos cultivos tuvieron contenidos similares en MS, PB y FND, pero a partir de dicha fecha la alfalfa presentó menor MS y FND y mayor PB que la esparceta ( $P < 0,05$ ; Figura 2). A pesar de dichas diferencias, las dos leguminosas presentaron una evolución similar. Las primeras semanas de producción presentaron contenidos en MS y FND bajos, y alto contenido en PB, evolucionando inversamente hasta el corte de principios de mayo, momento en el cual la planta estaba madura y presentaba el mayor contenido en MS ( $> 30\%$ ) y FND ( $> 55\%$ ) y un menor contenido en PB ( $< 12\%$ ) en ambos forrajes. Tal y como era de esperar, la mayor producción forrajera coincidió con la menor calidad nutritiva de las plantas, aunque durante todo el periodo de estudio el aprovechamiento por parte de los animales siempre se realizó entre periodo vegetativo (alfalfa) o vegetativo-inicio floración (esparceta).

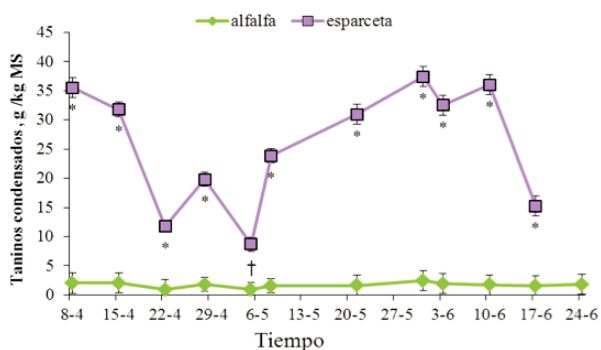
### Contenido de compuestos secundarios en los forrajes

Se determinaron los compuestos secundarios (taninos condensados, luteína, b-caroteno y  $\alpha$ -tocoferol) de los forrajes semanalmente desde la lactación hasta el inicio del verano. El contenido medio en taninos condensados totales fue muy escaso en la alfalfa (1,78 g equivalente cianidina/kg MS), mientras que la esparceta presentó un contenido muy superior (20,3 g equivalente cianidina/kg MS). En cuanto a su evolución, la alfalfa presentó un contenido constante durante todo el periodo de estudio, mientras que la esparceta presentó menores contenidos en los cortes en los que la producción forrajera era mayor, lo que pudo ser debido a una mayor proporción de tallos que de hojas, siendo en estas últimas donde más taninos condensados se depositan (Figura 3). La esparceta es una leguminosa con un



**FIGURA 2.** Evolución del contenido en materia seca (MS), proteína bruta (PB) y fibra neutro detergente (FND) de la alfalfa y la esparceta durante el periodo de pastoreo (de abril a agosto). Diferencias entre forrajes en el mismo momento de aprovechamiento, \* :P<0,05; †:P<0,1.

**FIGURE 2.** Evolution of the content of dry matter (DM), crude protein (CP) and neutral detergent fiber (NDF) of alfalfa and sainfoin during the grazing period (from April to August). Differences between forages at the same time, \* :P<0,05; †:P<0,1.



**FIGURA 3.** Evolución del contenido en taninos condensados totales (g equivalentes cianidina / kg MS) de la alfalfa y la esparceta durante la lactación de primavera (de abril a junio). Diferencias entre forrajes en el mismo momento de aprovechamiento, \* :P<0,05; †:P<0,1.

**FIGURE 3.** Evolution of total condensed tannins content (equivalents cyanidin g / kg DM) of alfalfa and sainfoin during lactation in spring (from April to June). Differences between forages at the same time, \* :P<0,05; †:P<0,1.

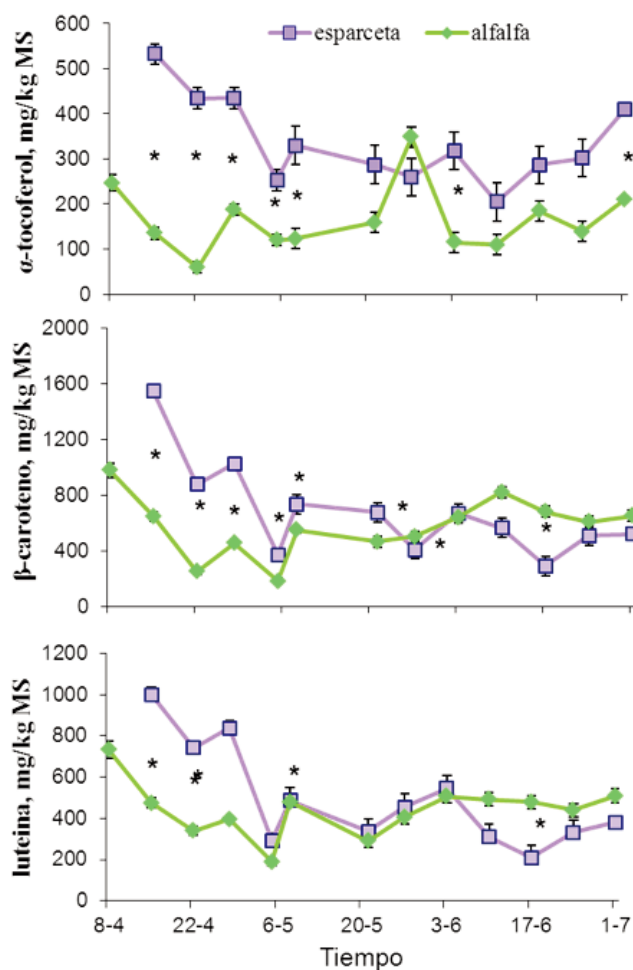
gran porte, que a medida que crece desarrolla mucho tallo, disminuyendo en su proporción de hojas. Por tanto, la mayor concentración de taninos condensados se da en el estadio vegetativo-inicio floración de la esparceta, de acuerdo con Theodoridou *et al.*, (2010), que también observaron en la esparceta un mayor contenido de taninos condensados en las hojas frente a los tallos, y también en el comienzo de la floración frente al final de la misma.

Los contenidos medios de luteína, b-caroteno y  $\alpha$ -tocoferol de la alfalfa y esparceta a lo largo del periodo estudiado se expresan en la Figura 4. En líneas generales, la esparceta presentó mayor contenido en  $\alpha$ -tocoferol que la alfalfa a lo largo del periodo estudiado. El contenido en carotenoides en la esparceta también fue superior al inicio del estudio (5 primeras semanas), igualándose durante las siguientes semanas (4 semanas siguientes coincidiendo en el mes de mayo) y disminuyendo su contenido en los últimos muestreos (junio). Estos resultados podrían estar parcialmente relacionados con el diferente esquema de crecimiento y con la variación en la proporción hoja:tallo a lo largo del ciclo productivo en ambas leguminosas. Las hojas contienen entre 5 y 10 veces más carotenoides que los tallos (Livingston *et al.*, 1968). Además, puede haber diferencias entre las dos leguminosas en la capacidad de almacenar dichos compuestos. Al inicio del periodo productivo (abril-principio de mayo) la planta presenta un estadio vegetativo, con una elevada proporción de hojas y un tallo poco lignificado, lo que se traduce en un bajo contenido en FND y elevado contenido en PB, coincidiendo con una producción media de forraje y unos elevados contenidos en carotenoides y tocoferol. Sin embargo, cuando se alcanzó una mayor producción de forraje, ambas leguminosas registraron una reducción notable del contenido en luteína y b-caroteno (P<0,05), lo que puede ser debido a la mayor relación tallo:hoja. Estos resultados deberían considerarse cuando se estudian posibles herramientas para certificar el sistema de alimentación recibido por el animal (Prache *et al.*, 1999).

### Producción de gas, de metano y desaparición de materia orgánica *in vitro*

Debido a que la técnica de producción de gas *in vitro* tiene una alta variabilidad, se utilizó una mezcla del líquido ruminal de cuatro moruecos para reducirla. Sin embargo, para obtener resultados concluyentes y/o extrapolables a futuros ensayos, sería necesaria la realización de varias réplicas de tandas, de tal manera que cada una se comportara como una repetición. No obstante, estos resultados nos pueden aportar una aproximación de lo que podría estar pasando *in vivo*.

Para estudiar la producción de gas de ambos cultivos, se tomaron 5 muestreos (15/4, 28/4, 8/5, 17/6, 5/8) con el fin de evaluar la influencia del momento del corte en dicho parámetro. La evolución de la producción de gas y metano y la desaparición de la materia orgánica (DMO) *in vitro* se muestra en

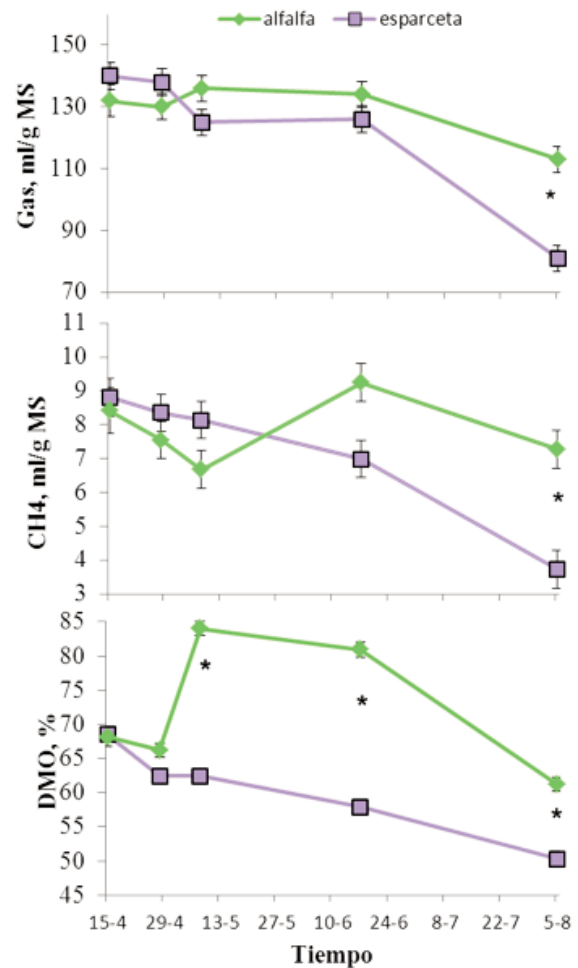


**FIGURA 4.** Evolución de los contenidos en  $\alpha$ -tocoferol,  $\beta$ -caroteno y luteína en la alfalfa y esparceta según el momento del pastoreo (de abril a julio). Diferencias entre forrajes en el mismo momento de aprovechamiento, \*  $P < 0,05$ .

**FIGURE 4.** Evolution of  $\alpha$ -tocopherol,  $\beta$ -carotene and lutein contents in alfalfa and sainfoin depending on the timing of grazing (from April to July). Differences between forages at the same time, \*  $P < 0.05$ .

la Figura 5. Respecto a estos parámetros, se observó una interacción entre el tipo de forraje y el momento de aprovechamiento ( $P < 0,01$ ). Los dos forrajes se comportaron de forma similar al inicio de su ciclo productivo (abril) en todos los parámetros *in vitro* estudiados, con valores similares en las producciones de gas y de metano y de DMO ( $P > 0,05$ ). Sin embargo, en el último muestreo realizado en agosto, se observó una reducción de la producción de gas y de metano, así como de la DMO ( $P < 0,01$ ) en relación a los demás cortes.

La alfalfa presentó unas producciones de gas y metano similares entre muestreos, excepto en el muestreo de agosto, que tuvo una producción inferior. En cuanto a la desaparición de la materia, se observó una mayor DMO en los cortes de mayo y junio, probablemente porque la planta estaba en un estadio vegetativo, mientras que en los cortes anteriores y en el posterior de agosto el estadio sería de inicio de botón floral.



**FIGURA 5.** Producción de gas y de metano en ml/g MS y desaparición de la materia orgánica (% DMO) *in vitro* de la alfalfa y de la esparceta según el momento del pastoreo (de abril a agosto). Diferencias entre forrajes en el mismo momento de aprovechamiento, \*  $P < 0,05$

**FIGURE 5.** *In vitro* gas and methane in ml/g DM and organic matter disappearance (% OMD) of alfalfa and sainfoin depending on the timing of grazing (from April to August). Differences between forages at the same time, \*  $P < 0.05$ .

En cuanto a la esparceta, su producción de gas y de metano fue inferior a la de la alfalfa, aunque de forma significativa únicamente en el corte de agosto ( $P < 0,05$ ). Se ha demostrado que los taninos condensados pueden reducir los gases de efecto invernadero (Kingston-Smith *et al.*, 2010). Algunos autores han observado una reducción de la producción de metano cuando se incluye esparceta en estudios *in vitro* (Theodoridou *et al.*, 2011b) e *in vivo* (Waghorn, 2008; Theodoridou *et al.*, 2011a). La falta de efecto claro de los taninos sobre la producción de gas está de acuerdo con los resultados observados por Hatew *et al.* (2015), quienes concluyeron que la estructura de los taninos condensados es más importante que el contenido. De ahí la controversia que existe en la actualidad con relación a la influencia de los taninos condensados sobre la producción de metano.

La reducción de la producción de gas y metano podría estar más relacionada con la reducción de la tasa de DMO. La

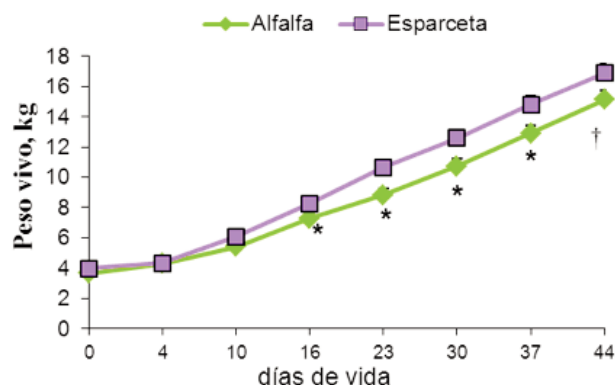
DMO de la esparceta fue disminuyendo a medida que avanzaba la fecha de aprovechamiento, presentando en el último muestreo una DMO inferior a la presentada a principios de abril ( $P < 0,05$ ). Si se comparan las dos forrajeras, la alfalfa presentó una DMO mayor a la registrada en la esparceta ( $P < 0,05$ ) excepto en los dos primeros muestreos ( $P > 0,05$ ). Todo ello puede estar relacionado con la mayor proporción de tallos de la esparceta, al ser una planta con mayor porte, especialmente en primavera.

## Parámetros productivos y reproductivos de los animales

La evolución del peso de los corderos criados junto con sus madres en parcelas de alfalfa o esparceta se muestran en la Figura 6. Los corderos del tratamiento de alfalfa presentaron menor ganancia media diaria durante la lactación que los corderos del lote de esparceta (269 vs. 302 g,  $P < 0,05$ ), pese a que la alfalfa presentó una mejor calidad, lo que puede estar relacionado con la presencia de determinados compuestos secundarios en estos forrajes, como los taninos condensados. Así, Dawson *et al.* (2011) observaron una mayor ganancia diaria en corderos destetados en pastoreo con la inclusión de taninos condensados (procedente del quebracho) en el concentrado con un bajo contenido en proteína; sin embargo no encontraron diferencias cuando el concentrado tenía un alto contenido en proteína. Al-Dobaib (2009) también mostró una mejora en las ganancias de los corderos con la inclusión de 2 % de quebracho en la dieta de corderos alimentados con alfalfa; en cambio cuando la inclusión fue del 1 y 3 % de quebracho no observó ningún efecto. Estos incrementos de las ganancias de peso debidos a los taninos condensados se atribuyen a la combinación del incremento del flujo de proteína en el intestino delgado y la disminución de la producción de metano en el rumen (Min *et al.*, 2006). Por lo tanto, el efecto de los taninos condensados sobre las ganancias de los corderos depende de la dosis, del contenido de proteína en la dieta y del tipo de tanino condensado. La edad al destete fue similar en ambos lotes (41 días), por lo que al presentar mejores crecimientos los corderos de esparceta tendieron a ser más pesados al destete ( $P = 0,10$ ).

La evolución del peso y la condición de las ovejas durante todo el periodo de pastoreo se muestra en la Figura 7. Durante la lactación, las ovejas de ambos lotes presentaron similar peso (51,2 kg  $\pm$  1,2 vs. 51,3 kg  $\pm$  1,2, para alfalfa y esparceta, respectivamente) y condición corporal. Sin embargo, tres semanas antes de empezar la cubrición y durante la misma las ovejas que pastaron alfalfa presentaron mejor estado corporal que las de esparceta ( $P < 0,05$ ), posiblemente debido a la menor producción y calidad de la esparceta en los cortes finales.

Los parámetros reproductivos de las ovejas que se cubrieron en parcelas de alfalfa o esparceta y los pesos vivos de su



**FIGURA 6.** Evolución del peso de los corderos durante el periodo de lactación junto con sus madres en parcelas de alfalfa o esparceta (de abril a mayo). Diferencias entre forrajes en el mismo momento de aprovechamiento, \*:  $P < 0,05$ ; †:  $P < 0,1$ .

**FIGURE 6.** Evolution of lamb weight during the lactation period with their dams in plots of alfalfa or sainfoin (from April to May). Differences between forages at the same time, \*:  $P < 0,05$ ; †:  $P < 0,1$ .

	Alfalfa	Esparceta	e.e. <sup>1</sup>	P-valor
Número de ovejas	21	21		
Fertilidad (%)	91	90		0,99
Prolificidad (corderos/parto)	1,9	1,5	0,1	0,02
Mortalidad al nacimiento (%)	25,7	7,4		0,26
Ratio hembra/macho	57/43	72/28		0,23
Numero de corderos vivos	28	25		
Peso al nacimiento (kg)	3,5	4,3	0,2	0,02
de las hembras (kg)	3,4	4,3	0,2	0,01
de los machos (kg)	3,7	4,5	0,2	0,08

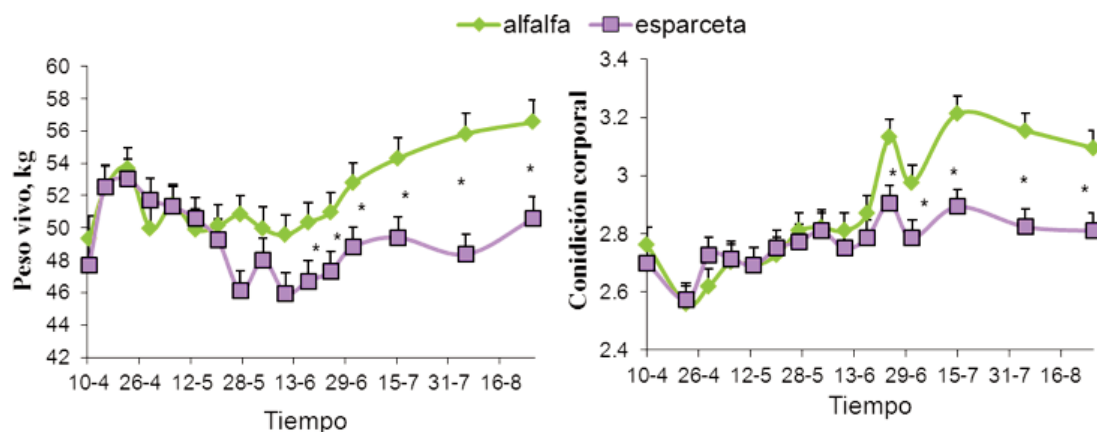
<sup>1</sup> error estándar de la media.

**TABLA 2.** Parámetros reproductivos de ovejas Rasa Aragonesa en pastoreo de alfalfa o esparceta durante la cubrición (junio-agosto 2014), y pesos vivos de su descendencia (enero 2015).

**TABLE 2.** Reproductive parameters of Rasa Aragonesa's ewes grazing alfalfa or sainfoin during mating (June-August 2014), and birth weight of their offspring (January 2015).

descendencia se muestran en la Tabla 2. La fertilidad de las ovejas en ambos lotes fue similar (90,5 %). La prolificidad de las ovejas que se cubrieron mientras pastaban alfalfa fue superior a la de las que pastaban esparceta ( $P < 0,05$ ). La prolificidad se ha relacionado de manera positiva con el peso vivo y la condición corporal de las ovejas en el momento de la cubrición (Coop, 1962). Por lo tanto, las diferencias encontradas en este estudio podrían deberse al mayor peso vivo que presentaron las ovejas en alfalfa frente a las ovejas en esparceta durante la cubrición. La mayor prolificidad en ovejas pastoreando alfalfa durante la cubrición coincide con varios autores cuando la comparan con pastos senescentes (Robertson *et al.*, 2015) y una mayor tasa de ovulación cuando la comparan con praderas de *Phalaris aquatica* (King *et al.*, 2010). El mayor peso encontrado en los corderos al nacimiento ( $P < 0,05$ ) de las ovejas cubiertas en pastoreo de esparceta podría deberse a la menor prolificidad de sus madres, ya que los corderos procedentes de partos simples presentan mayor peso frente a los partos múltiples (Quintero *et al.*, 1997; Macedo y Arredondo,





**FIGURA 7.** Evolución del peso vivo y de la condición corporal de las ovejas durante el periodo de pastoreo de alfalfa o esparceta (de abril a agosto). Diferencias entre forrajes en el mismo momento de aprovechamiento, \*  $P < 0,05$ .

**FIGURE 7.** Evolution of live weight and body condition of sheep during the grazing period of alfalfa or sainfoin (from April to August). Differences between forages at the same time, \*  $P < 0.05$ .

2008), y normalmente disminuye la mortalidad de corderos en el periparto. En el presente ensayo sorprendió el desequilibrio observado en el ratio de hembras/machos, a favor de las hembras (57/43 y 72/28, para alfalfa y esparceta respectivamente). El ratio del sexo de la descendencia puede estar influido por la dieta recibida por la madre (Kent, 1995; Rosenfeld y Roberts, 2004), o por la condición corporal de la oveja en el momento de la cubrición, con un mayor porcentaje de hembras en ovejas con baja condición corporal (Clutton-Brock y Iason, 1986; Pergament *et al.*, 2002). Además de la condición corporal, otros factores como el estrés, el comportamiento sexual, los perfiles hormonales, el momento de la inseminación o cubrición pueden influir en el sexo de la descendencia. No se ha observado un efecto claro de la presencia de taninos condensados en concentración baja-moderada sobre los parámetros reproductivos. Sin embargo, hay estudios que muestran un efecto beneficioso de la presencia de taninos condensados sobre los parámetros reproductivos (Blache *et al.*, 2008). Varios estudios que valoraban el efecto del pastoreo de *Lotus corniculatus* frente al pastoreo de raigrás/trébol blanco durante la cubrición, observaron una mayor tasa de ovulación y prolificidad para el primer tipo de pasto (Min *et al.*, 2001; Ramírez-Restrepo y Barry, 2005; Viñoles *et al.*, 2009). Es probable que también la estructura del tanino condensado, además de la cantidad de tanino condensado ingerida, influya en el efecto que éstos tienen sobre la reproducción.

## CONCLUSIONES

La esparceta podría ser una buena alternativa forrajera a la alfalfa durante la lactación, ya que podría producir menos emisiones de metano y los resultados muestran una influencia positiva del pastoreo de esparceta sobre la ganancia media diaria de los corderos durante la lactación. Sin embargo, las ovejas del lote esparceta fueron perdiendo peso a lo largo del ensayo, pudiendo afectar a algunos parámetros reproductivos.

Será necesario confirmar estos resultados en estudios posteriores con un mayor número de animales y pesos similares al inicio de la cubrición.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores del presente trabajo desean agradecer al personal del CITA, especialmente a I. Escota, F. Gracia, E. Echegoyen y M.A. Céspedes por su ayuda en el control de los animales. También desean agradecer a M.A. Legua y P. Eserverri su ayuda en los análisis químicos. Este trabajo ha sido financiado por los proyectos INIA-RTA-2012-080-00 e INIA-RZP-2013-00001-00-00. S. Lobón y P.J. Rufino disfrutaron de becas predoctorales del Gobierno de Aragón y de INIA, respectivamente.

## BIBLIOGRAFIA

- ABECIA J.A., SOSA C., FORCADA F., Y MEIKLE A. (2006) The effect of undernutrition on the establishment of pregnancy in the ewe. *Reproduction Nutrition Development*, 46, 367-378.
- AL-DOBAIB S. N. (2009) Effect of different levels of Quebracho tannin on nitrogen utilization and growth performance of Najdi sheep fed alfalfa (*Medicago sativa*) hay as a sole diet. *Animal Science Journal*, 80(5), 532-541.
- AOAC. 1999. Official methods of analysis, AOAC International, Maryland, U.S.A.
- BLACHE D., MALONEY S.K. Y REVELL D.K. (2008) Use and limitations of alternative feed resources to sustain and improve reproductive performance in sheep and goats. *Animal Feed Science and Technology*, 147, 140-157.
- BLOOMFIELD F.H. (2011) Epigenetic modifications may play a role in the developmental consequences of early life events. *Journal of Neurodevelopmental Disorders*, 3, 348-355.

- CLUTTON-BROCK T.H. Y IASON G.R. (1986) Sex ratio variation in mammals. *Quarterly Review of Biology*, 61, 339-374.
- COOP I. E. (1962) Liveweight-productivity relationships in sheep. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 5(3-4), 249-264.
- DAWSON L.E.R., MCCOY M.A., EDGAR H.W.J. Y CARSON A.F. (2011) Effect of concentrate supplementation at pasture and inclusion of condensed tannins (Quebracho) in concentrates on lamb performance and faecal egg and worm counts. *Livestock Science*, 135(2-3), 205-214.
- DELGADO I., ANDRÉS C. Y MUÑOZ F. (2008) Effect of the environmental conditions on different morphological and agronomical characteristics of sainfoin. En: Porqueddu C. y Tavares de Sousa M.M. (Eds) *Sustainable Mediterranean grasslands and their multi-functions*, pp 199-202. Zaragoza: CIHEAM / FAO / ENMP / SPPF.
- EUROPEAN COMMUNITIES (1986) Council Directive 86/609/EEC of 24 November 1986 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes. *Official Journal of the European Communities*, L358 (L358), 1-29.
- GRABBER J.H., ZELLER W.E. Y MUELLER-HARVEY I. (2013) Acetone enhances the direct analysis of procyanidin- and prodelphinidin-based condensed tannins in lotus species by the butanol-HCl-iron assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 2669-2678.
- HATEW B., HAYOT CARBONERO C., STRINGANO E., SALES L.F., SMITH L.M.J., MUELLER-HARVEY I., HENDRIKS W.H. Y PELLIKAAN W.F. (2015) Diversity of condensed tannin structures affects rumen in vitro methane production in sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) accessions. *Grass Forage Science*, 70, 474-490.
- JONES W.T., ANDERSON L.B. Y ROSS M.D. (1973) Bloat in cattle, XXXIX. Detection of protein precipitants (flavolans) in legumes. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 16, 441-446.
- KENT J.P. (1995) Birth sex ratios in sheep over nine lambing seasons: years 7-9 and the effects of ageing. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 36, 101-104.
- KING B.J., ROBERTSON S.M., WILKINS J.F. Y FRIEND M.A. (2010) Short-term grazing of lucerne and chicory increases ovulation rate in synchronised Merino ewes. *Animal Reproduction Science*, 121(3-4), 242-248.
- KINGSTON-SMITH A.H., EDWARDS J.E., HUWS S.A., KIM E.J., Y ABBERTON M. (2010) Plant-based strategies towards minimising livestock's long shadow. *Proceedings of the Nutrition Society*, 69, 613-620.
- LIVINGSTON A.L., SMITH D., CARNAHAN H.L., KNOWLES R.E., NELSON J.W. Y KOHLER G.O. (1968) Variation in the xanthophyll and carotene content of lucerne, clovers and grasses. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 19, 632-636.
- MACEDO R. Y ARREDONDO V. (2008) Effect of sex, type of birth and lactation on growth of pelibuey sheep under intensive management. *Archivos de Zootecnia*, 57, 219-228.
- MARTINIELLO P. (1998) Influence of agronomic factors on the relationship between forage production and seed yield in perennial forage grasses and legumes in a Mediterranean environment. *Agronomie*, 18, 591-601.
- MENKE K. H. Y STEINGASS H. (1988) Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. *Animal Research and Development*, 28, 7-55.
- MIN B.R., BARRY T.N., ATTWOOD G.T. Y MCNABB W.C. (2003) The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review. *Animal Feed Science and Technology*, 106, 3-19.
- MIN B.R., FERNANDEZ J.M., BARRY T.N., MCNABB W.C. Y KEMP P.D. (2001) The effect of condensed tannins in *Lotus corniculatus* upon reproductive efficiency and wool production in ewes during autumn. *Animal Feed Science and Technology*, 92, 185-202.
- MIN B.R., PINCHAK W.E., ANDERSON R.C., FULFORD J.D. Y PUCHALA R. (2006) Effects of condensed tannins supplementation level on weight gain and in vitro and in vivo bloat precursors in steers grazing winter wheat. *Journal of Animal Science*, 84(9), 2546-2554.
- MOLAN A.L., WAGHORN G.C., MIN B.R. Y MCNABB W.C. (2000) The effect of condensed tannins from seven herbage on *Trichostrongylus colubriformis* larval migration in vitro. *Folia Parasitologica*, 47, 39-44.
- NIEZEN J.H., WAGHORN T.S., CHARLESTON W.A. Y WAGHORN G.C. (1995) Growth and gastrointestinal nematode parasitism in lambs grazing either lucerne (*Medicago sativa*) or sulla (*Hedysarum coronarium*) which contains condensed tannins. *Journal of Agricultural Science*, 125, 281-289.
- PEEL M.D., ASAY K.H., JOHNSON D.A. Y WALDRON B.L. (2004) Forage production of sainfoin across an irrigation gradient. *Crop Science*, 44, 614-619.
- PRACHE S. Y THERIEZ M. (1999) Traceability of lamb production systems: Carotenoids in plasma and adipose tissue. *Animal Science*, 69, 29-36.
- PERGAMENT E., TODYDEMIR P.B. Y FIDDLER M. (2002) Sex ratio: a biological perspective of 'Sex and the City'. *Reproductive biomedicine online*, 5, 43-46.
- QUINTERO A., BOSCAN J., PALOMARES R., GONZÁLEZ A. Y BOISSIERE J. (1997) Efecto del sexo sobre el peso corporal a diferentes edades en corderos West-African criados en el trópico venezolano. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*, 5, 426-427.
- RAMÍREZ-RESTREPO C.A. Y BARRY T.N. (2005) Alternative temperate forages containing secondary compounds for improving sustainable productivity in grazing ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 120, 179-201.
- RHIND S.M. (2004) Effects of maternal nutrition on fetal and neonatal reproductive development and function. *Animal Reproduction Science*, 82-83, 169-181.

- ROBERTSON S.M., CLAYTON E.H. Y FRIEND M.A. (2015) Reproductive performance of ewes grazing lucerne during different periods around mating. *Animal Reproduction Science*, 162, 62-72.
- ROSENFELD C.S. Y ROBERTS R.M. (2004) Maternal diet and other factors affecting offspring sex ratio: a review. *Biology of Reproduction*, 71, 1063-1070.
- THEODORIDOU K., AUFRÈRE J., ANDUEZA D., LE MORVAN A., PICARD F., STRINGANO E., POURRAT J., MUELLER-HARVEY I. Y BAUMONT, R. (2011a) Effect of plant development during first and second growth cycle on chemical composition, condensed tannins and nutritive value of three sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) varieties and lucerne. *Grass Forage Science*, 66, 402-414.
- THEODORIDOU K., AUFRÈRE J., ANDUEZA D., POURRAT J., LE MORVAN A., STRINGANO E., MUELLER-HARVEY I. Y BAUMONT R. (2010) Effects of condensed tannins in fresh sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) on in vivo and in situ digestion in sheep. *Animal Feed Science and Technology*, 160, 23-38.
- THEODORIDOU K., AUFRÈRE J., NIDERKORN V., ANDUEZA D., LE MORVAN A., PICARD F. Y BAUMONT R. (2011b) In vitro study of the effects of condensed tannins in sainfoin on the digestive process in the rumen at two vegetation cycles. *Animal Feed Science and Technology*, 170, 147-159.
- UDÉN P., ROBINSON P.H., MATEOS G.G. Y BLANK R. (2012) Use of replicates in statistical analyses in papers submitted for publication in *Animal Feed Science and Technology*. *Animal Feed Science and Technology*, 171, 1-5.
- VAL J., MONGE E. Y BAKER N.R. (1994) An improved HPLC method for rapid analysis of the xanthophyll cycle pigments. *Journal of Chromatographic Science*, 32, 286-289.
- VAN SOEST P.J., ROBERTSON J.B. Y LEWIS B.A. (1991) Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of dairy science*, 74, 3583-3597.
- VIÑALES C., MEIKLE A. Y MARTIN G.B. (2009) Short-term nutritional treatments grazing legumes or feeding concentrates increase prolificacy in Corriedale ewes. *Animal Reproduction Science*, 113, 82-92.
- WAGHORN G. (2008) Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production—Progress and challenges. *Animal Feed Science and Technology*, 147, 116-139.
- WAGHORN G.C., ULYATT M.J., JOHN, A. Y FISHER M.T. (1987) The effect of condensed tannins on the site of digestion of amino acids and other nutrients in sheep fed on *Lotus corniculatus* L. *British Journal of Nutrition*, 57(1), 115-126.
- WANG Y., WAGHORN G.C., MCNABB W.C., BARRY T.N., HEDLEY M.J. Y SHELTON I.D. (1996) Effect of condensed tannins in *Lotus corniculatus* upon the digestion of methionine and cysteine in the small intestine of sheep. *Journal of Agricultural Science*, 127(3), 413-421.